

EP00/9217



REC'D 08 DEC 2000

WIPO PCT

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 51 543.3

Anmeldetag: 26. Oktober 1999

Anmelder/Inhaber: GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GmbH, Oberschleißheim/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten
Antigenen

Priorität: 21.09.1999 DE 199 45 171.0

IPC: C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Dzierzon

PATENT- UND MARKENANWÄLTE
EUROPEAN PATENT AND TRADEMARK ATTORNEYS

DR. rer.nat. HORST REINHARD (-1998)
DIPL.- ING. UDO SKUHRA
DIPL.- ING. REINHARD WEISE
DR. rer.nat. WERNER BEHNISCH
DR. rer.nat. STEPHAN BARTH
DIPL.- ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.- DIPL.- ING. GLYN CHARLES (DPA)
FRIEDRICHSTR. 31 * MOHRENSTR. 20
D-80801 MÜNCHEN D-96450 COBURG
P.O. BOX 440151 Tel. +49-9561-871538
D-80750 MÜNCHEN Fax. +49-9561-871539
Tel. +49-89-3816100
Fax. +49-89-3401479

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

München/Munich

P11774
Dr.B/Go

26. Oktober 1999

Anmelder: GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

**VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON
MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell-Antigenen.

Zwei Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung bilden die konzeptionelle Basis der gegenwärtigen Tumorimmunologie: 1. Die Tumorentstehung ist Folge genetischer



Veränderungen der Zelle, die zur Expression aberranter Genprodukte führen. 2. T-Zellen sind in der Lage, solche Veränderungen im Proteinmuster entarteter Zellen zu erkennen.

Voraussetzung für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort ist die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Die molekulare Identifizierung von T-Zell-Tumorantigenen schafft demnach die Voraussetzung für die Entwicklung Antigen-spezifischer Vakzinen sowie anderer Formen T-Zell-vermittelter Immuntherapien.

In den letzten Jahren wurden insbesondere beim malignen Melanom mehrere Antigene identifiziert, die von autologen T-Zellen der Patienten erkannt werden. Ein möglicher therapeutischer Nutzen dieser Antigene wird momentan im Rahmen klinischer Studien untersucht. Für eine breite klinische Anwendung ist es allerdings notwendig, möglichst viele Tumorantigene zu identifizieren, denn: 1. Die bisher bekannten Antigene werden in der Regel nur in einem kleinen Prozentsatz aller malignen Melanome exprimiert und sind somit nur bei einem kleinen Patientenkollektiv anwendbar. 2. Da Antigene als Peptide von HLA-Molekülen präsentiert werden und HLA-Moleküle in der menschlichen Population hochpolymorph sind, muß man möglichst viele Antigene identifizieren, um für jede HLA-Konstellation Antigene zur Vakzinierung zur Verfügung zu haben. 3. Vakzinierungen mit nur einem Antigen führen häufig zur Abschaltung dieses Antigens durch den Tumor und damit zur Resistenzentwicklung. Solcher Resistenzentwicklung soll durch eine gleichzeitige Vakzinierung mit möglichst vielen Antigenen vorgebeugt werden. Die Identifizierung weiterer Tumorantigene beim Melanom als auch bei anderen Tumoren ist somit zwingende Voraussetzung für erfolgreiche Immuntherapien.

Experimentell setzt sich die Identifizierung von Tumorantigenen aus zwei Teilschritten zusammen. Erstens, der Isolierung Tumor-spezifischer T-Zellen des Patienten durch wiederholte in vitro Stimulation mit autologen Tumorzellen, und zweitens, der molekularen Identifikation der von den T-Zellen erkannten Antigene. Hierfür ist ein einfaches und allgemein anwendbares Verfahren wünschenswert.

Aus dem Stand der Technik sind bereits einige Methoden zur Identifizierung von MHC-restringierten T-Zell Antigenen bekannt. Die bekannten Lösungsansätze umfassen insbesondere die folgenden Verfahren (Rosenberg, 1999):

Transiente Transfektion von allogenen oder xenogenen Zelllinien;
Elution und HPLC Fraktionierung MHC gebundener Peptide;
Retrovirale Transduktion von autologen Fibroblasten.

Diese Methoden und die damit verbundenen Nachteile werden nachfolgend näher dargestellt.

1. *Transiente Transfektion von allogenen/xenogenen Zelllinien (1,2)*

Diese Methode beruht auf der Expression von cDNA Banken aus Tumoren in etablierten Zelllinien. Als Zielzellen werden hierfür 293 oder COS-7 Zellen verwendet, die sich sehr effizient transfizieren lassen. Bezogen auf den HLA Genotyp des jeweiligen Patienten handelt es sich dabei allerdings um allogene (293) bzw. xenogene (COS-7) Zelllinien. Da T-Zellen MHC-restringent sind, d.h. Antigen nur in Verbindung mit einem entsprechenden MHC-Molekül erkennen, ist die Kenntnis der Restriktionselemente notwendige Voraussetzung für eine Identifizierung von Antigenen. Eine T-Zell Erkennung der eingebrachten Antigene wird nur über die Co-Transfektion des jeweiligen Restriktionselements ermöglicht. Die Identifizierung des jeweiligen Restriktionselements ist aber oftmals schwierig oder gar unmöglich. Da die verwendeten Zielzellen darüber hinaus MHC Klasse II negativ sind, ist diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen mit bekanntem Restriktionselement beschränkt.

2. *Biochemische Identifikation des Antigens (3)*

Neben der Expressionsklonierung ist eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Tumorantigenen auch auf biochemischem Wege möglich. Dazu werden Tumorzellen lysiert und die restringierenden MHC Moleküle mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunpräzipitiert. Aus diesen MHC Molekülen werden die daran gebundenen Peptide eluiert und über ~~reverse phase HPLC~~ aufgetrennt. Anschließend werden Zielzellen mit den einzelnen Peptid-Fractionen beladen. Diese Zielzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie nur das jeweilige Restriktionselement in Peptid-ungebundener Form exprimieren. Die exogene Zugabe von Peptiden führt deshalb rasch zu einer Bindung durch die "leeren" MHC Moleküle. Durch Co-Kultivierung dieser Peptid-beladenen Zielzellen mit tumorspezifischen T-Zellen werden positive Fractionen identifiziert und über die Peptid-Sequenz das Antigen ermittelt. Wie bereits unter 1, so ist auch hier die Kenntnis des HLA-Restriktionselements

unabdingbare Voraussetzung für die Identifizierung von T-Zell-Antigenen, und zwar erstens für die Immunpräzipitation der restringierenden MHC Moleküle und zweitens für die Beladung entsprechender Zielzellen mit den eluierten Peptiden. Ein zusätzlicher Nachteil liegt in der enorm großen Tumormenge, die für die Peptid-Gewinnung benötigt wird, so daß diese Methode nur bei Tumoren angewendet werden kann, die sich gut in vitro kultivieren und expandieren lassen. Eine Identifizierung von T-Zell-Antigenen ist auch bei dieser Methode auf MHC Klasse I-restringierte Antigene beschränkt, da eine analoge HPLC Fraktionierung von MHC Klasse II-Peptiden durch deren Längen-Heterogenität unmöglich ist.

3. *Retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten (4)*

Das oben beschriebene Problem der notwendigen Identifikation des Restriktionselements wird hinfällig, wenn autologe Zielzellen für die Expression der cDNA Bank aus dem Tumor verwendet werden. Für die Durchführung eines Antigen-Screenings werden große Zellmengen benötigt, so daß als Zielzellen nur solche Zellen des Patienten in Frage kommen, die sich in vitro entsprechend expandieren lassen. Fibroblasten lassen sich aus kleinen Hautbiopsien gewinnen und zudem sehr gut retroviral transduzieren. Die Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen durch die retrovirale Transduktion autologer Fibroblasten mit cDNAs aus Tumoren wurde deshalb als Methode vorgestellt, welche die Definition des Restriktionselements überflüssig machen soll. Diese Methode ist allerdings mit einigen Nachteilen behaftet. Primäre Fibroblasten können nur eine begrenzte Anzahl an Passagen in vitro kultiviert werden. Da Fibroblasten außerdem kein MHC Klasse II exprimieren, ist auch diese Methode auf die Identifizierung von MHC Klasse I-restringierten Antigenen beschränkt. Im Vergleich zur transienten Expressionsklonierung, wie unter 1 beschrieben, ist die retrovirale Transduktion der Zielzellen mit einem wesentlich größeren Arbeitsaufwand verbunden. Der Hauptnachteil dieser Methode ist allerdings in der ~~vergleichsweise niedrigen Expression der retroviral eingebrachten Gene zu sehen. Dieses~~ niedrige Expressionsniveau bedingt eine im Vergleich zur transienten Transfektion etwa 10-fach geringere Sensitivität und somit einen 10-fach höheren Screening-Aufwand.

Es ist eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das die oben beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet, insbesondere eine Kenntnis des restringierenden MHC Moleküls nicht erfordert, eine unbegrenzte Proliferation der Zielzellen

erlaubt und gleichzeitig eine Identifizierung sowohl von MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-restringierten Antigenen ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen, der nachfolgenden Beschreibung sowie den Ausführungsbeispielen und Abbildungen. Die Abbildungen zeigen:

Abbildung 1: LCL Infektion mit Influenza

Zur Bestimmung der Influenza Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren inkubiert, welche das Gen für das green fluorescence protein tragen. Nach 24 Stunden wurden die unter UV-Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Abbildung 2: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinantem Influenza-Virus. LCL 1.11 wurden mit Wildtyp (wt) bzw. rekombinanten Influenza Viren infiziert. Nach viraler Transduktion des Modellantigens (MA) in LCL 1.11 kommt es zu einer GM-CSF Freisetzung durch den Modellantigen-spezifischen T-Zell-Klon, nicht aber nach Wildtyp Virus (wt) Infektion oder nach Infektion mit GFP-Gen-tragenden Influenza Viren.

Abbildung 3: LCL Infektion mit Retroviren

1×10^5 Zellen der EBV immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinie LCL 1.26 wurden mit rekombinanten Retroviren infiziert, welche das green fluorescence protein exprimieren. 72 Stunden nach Infektion wurden die grün leuchtenden Zellen gezählt.

Abbildung 4: Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinanten Retroviren.

1×10^5 Zellen der lymphoblastoiden Zelllinie LCL1.11 wurden retroviral mit dem Neomycin Posphotransferase II Gen (Pinco-NeoR) bzw. mit dem



green fluorescence protein Gen (Pinco-GFP) transduziert. 72 Stunden später wurden die infizierten bzw. nicht-infizierte LCL1.11 Zellen mit 1×10^5 T-Zellen inkubiert. Die verwendeten, MHC Klasse II restringierten T-Zellen sind spezifisch für ein auf HLA-DP3 präsentiertes Epitop des Neomycin Phosphotransferase II Proteins. Nach 24 stündiger Co-Kultivierung der Zellen wurde die GM-CSF Konzentration im Zellüberstand mittels eines ELISAs ermittelt.

Die vorliegende Erfindung schafft somit ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen, und zwar sowohl von MHC Klasse I und/oder Klasse II restringierten Antigenen. Die nachfolgenden Schritte werden dabei vom erfindungsgemäßen Verfahren mitumfaßt:

- a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;
- b) Herstellen rekombinanter Influenza-Viren oder Retroviren, die in ihrer Virushülle ein oder mehrere rekombinante pseudo-virale, von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Gensegmente enthalten;
- c) Gewinnen der rekombinanten Viruspartikel;
- d) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den rekombinanten Viruspartikeln;
- e) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
- ~~f) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;~~
- g) Stimulieren der T Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- h) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizieren des Antigens.

Die Erfindung geht davon aus, daß aus einer Zelle, beispielsweise einer tierischen oder menschlichen Zelle, die mRNA isoliert und eine cDNA-Bank angelegt wird. Hierbei kann es

sich auch um Zellen handeln, die mit einem Mikroorganismus infiziert sind, beispielsweise einem Bakterium, einem Virus oder einem Pilz oder einen Protozoen. Selbstverständlich sind auch mischinfizierte Zellen möglich. Alternativ zu einer Herstellung einer cDNA-Bank kann auch von einer Genbank ausgegangen werden, die auch direkt aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus hergestellt werden kann.

In einem nächsten Schritt wird die cDNA oder die DNA der Genbank in die Virushülle von Influenza-Viren oder Retroviren eingebracht, wodurch rekombinante Influenza-Viren bzw. Retroviren entstehen. Bevorzugt wird als Influenza-Virus ein Influenza A-Virus eingesetzt. Als Retroviren werden bevorzugt amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren eingesetzt. Ein weiteres Beispiel für Retroviren ist die Gruppe der Lentiviren, wobei hier insbesondere HIV erwähnt werden soll.

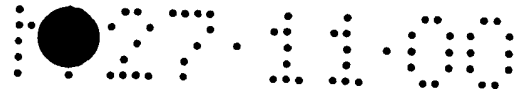
Beispiele für amphotrope Retroviren sind genannt in Kinsella et al., (1996); Beispiele für pseudotypisierte Retroviren sind genannt in Miletic et al., (1999).

Die Herstellung rekombinanter Retroviren ist beschrieben in Kinsella et al., (1996); die Herstellung rekombinanter Influenza-Viren ist beschrieben in Neumann et al., (1999).

Die rekombinanten Viren werden auf geeigneten Wirtszellen vermehrt und durch an sich bekannte Methoden isoliert. Mit diesen rekombinanten Retroviren bzw. Influenza-Viren werden dann immortalisierte autologe Zellen, bevorzugt B-Zellen oder dendritische Zellen, die MHC Klasse I- und/oder MHC Klasse II-Moleküle exprimieren, infiziert. Hieran schließen sich die Schritte e) bis h) wie oben beschrieben, an.

Erfindungsgemäß wird unter "autolog" die Herkunft der Zellen verstanden, d.h. die Zellen stammen aus demselben Individuum wie die T-Zellen, mit denen das Screening auf Antigenexpression durchgeführt wird.

Voraussetzung für die vorliegende Erfindung ist natürlich, daß T-Zellklone eingesetzt werden, die ein Antigen in bestimmten Zellen erkennen. Da die Identität des von den T-Zellen erkannten Antigens unbekannt ist, soll herausgefunden werden, welches Antigen von den T-Zellen erkannt wird. Die Verfügbarkeit der T-Zellklone sagt somit nichts über die Natur des



Antigens aus. Beispielsweise geht man von T-Zellklonen aus, die eine Prostata-Karzinomlinie erkennen, nicht aber EBV-immortalisierte Zellen sowie Fibroblasten desselben Individuums. Ziel ist es nunmehr, mit Hilfe einer cDNA-Bank aus den Prostatakarzinomzellen, den autologen EBV-immortalisierten Zellen als Empfängerzellen für die cDNA-Bank und den spezifischen T-Zellklonen das noch unbekannte Antigen zu identifizieren.

Nachfolgend wird die Erfindung im einzelnen ausgeführt.

Der Erfindung vorausgegangen war die Etablierung von tumorspezifischen T-Zell-Klonen. Da T-Zellen Antigen nur in Verbindung mit MHC Molekülen erkennen, bei einigen Klonen eine Identifizierung des restringierenden MHC Moleküls aber nicht möglich war, konnten bereits etablierte Methoden zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen für diese Klone nicht angewendet werden. Da Zellen unterschiedlicher Gewebe eines Individuums identische MHC Moleküle exprimieren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, autologe B-Zellen des Patienten als Empfängerzellen für die Expression von cDNA Banken aus dem Tumor nutzbar zu machen. B-Zellen von jedem beliebigen Individuum können mit Epstein-Barr Virus, einem humanen Vertreter der Lymphocryptovirus-Gruppe oder verwandten Primaten-Viren dieser Gruppe infiziert, immortalisiert und in praktisch unbegrenzter Menge als sog. lymphoblastoide Zelllinien (LCL) verfügbar gemacht werden. Die Verwendung von autologen LCL als Zielzellen erübrigt die teilweise schwierige bis unmögliche Identifizierung der MHC Restriktionselemente. Da LCL konstitutiv MHC Klasse I und Klasse II exprimieren, ist sowohl eine Identifikation von MHC Klasse I-restringierten Antigenen, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, als auch von MHC Klasse II-restringierten Antigenen, die von T-Helferzellen erkannt werden, möglich.

Die Verwendung von autologen LCL des Patienten als Zielzellen setzt allerdings einen effizienten Gentransfer in diese Zellen voraus, der bisher weder durch chemische noch physikalische Transfektionsmethoden erzielt werden konnte. Über die Infektionsrate von LCL mit Viren ist vergleichsweise wenig bekannt. Wie im folgenden beschrieben, wird durch die Verwendung von rekombinanten Influenza A Viren erstens eine einzigartig effiziente Infektion von LCL erreicht, zweitens kommt es durch die Verwendung der viruseigenen

regulatorischen Elemente zu einer unübertroffen hohen Genexpression der eingebrachten Erbinformation, was eine hohe Sensitivität und somit Einfachheit des Nachweises bedingt.

Die hier beschriebene Nutzung von Influenza A Virus abgeleiteten Vektoren für den Gentransfer in LCL setzte eine Bestimmung der Infektionseffizienz voraus. Wie in Abbildung 1 gezeigt, werden bis zu 80% der lymphoblastoiden Zelllinien LCL1.26 mit Influenza infiziert.

Neben einer hohen Infektionsrate mußten für die beabsichtigte Anwendung auch eine Reihe von Voraussetzungen erfüllt sein, damit eine Nutzung des Influenza Virussystems zum genannten Zweck möglich wird. Es war jedoch unklar und nicht vorhersehbar, ob die erfindungsgemäße Kombination einzelner Verfahrensschritte die Problemstellung der Erfindung löst.

1. *Expressionsniveau des eingebrachten Fremdgens?*

Für eine hohe Sensitivität des Nachweisverfahrens ist eine hohe Expressionsrate der in die Zellen eingebrachten Fremdsequenz essentiell. Durch die Nutzung der viralen Transkriptions/Translations-Maschinerie konnte, wie in Western Analysen für ein Modellantigen nachgewiesen, eine etwa 5-fach höhere Expressionsrate als nach transienter Transfektion und ein etwa 10-fach höheres Expressionsniveau als nach retroviraler Transduktion erzielt werden.

2. *Virale Interferenz mit Antigen-Präsentation und -Erkennung?*

Für mehrere Viren ist bekannt, daß sie mit der Antigenpräsentation interferieren und so einer Immunerkennung entgehen. Um für Influenza A Virus analoge Mechanismen auszuschließen, wurde ein für ein Modellantigen kodierendes Gen in Influenza Virus eingebracht und LCLs damit infiziert. Die MHC Präsentation des Modellantigens wurde durch einen Modellantigen-spezifischen T-Zell-Klon ermittelt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, interferiert Influenza Virus nicht mit der Präsentation des Antigens. Darüber hinaus kommt es durch die Influenza Virus-Infektion weder zu einer unspezifischen T-Zell-Aktivierung noch zu einer Zytokinfreisetzung durch die infizierten LCL.



3. *Infektion der T Zellen?*

Der Nachweis einer T-Zell-Aktivierung setzt eine mindestens 20-stündige Co-Kultivierung von Zielzellen und T-Zellen voraus. Eine mögliche Infektion von T-Zellen durch Influenza Virus (aus dem Überstand oder freigesetzt aus LCL) und eine nach 8 Stunden einsetzende Lyse der Zellen würde den Nachweis einer spezifischen T-Zell-Aktivierung unmöglich machen. Wie ebenfalls mit Hilfe des Green Fluorescence Protein (GFP) nachgewiesen werden konnte, infiziert Influenza T-Zellen unerwarteter Weise nicht.

Zur Bestimmung der Influenza-Infektionsrate von LCL wurde die Zelllinie LCL 1.26 mit rekombinanten Influenza-Viren inkubiert, welche das Gen für das Green Fluorescence Protein tragen. Nach 24 Stunden wurden die unter UV Licht grün leuchtenden Zellen gezählt.

Als mögliche Alternative zum Gentransfer durch rekombinante Influenza Viren kamen auch rekombinante Retroviren in Betracht und wurden deshalb in unsere Untersuchungen mit einbezogen. Eine sehr gute Effizienz des Gentransfers ließ sich, wie in Abbildung 3 gezeigt, auch mit rekombinanten Retroviren erreichen. Mit Hilfe von Modellantigenen konnte auch mit rekombinanten Retroviren eine Antigen-spezifische T-Zell-Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 4). Allerdings erreichen Retroviren nicht das hohe Expressionsniveau von Influenza Viren.

Nachfolgend wird die Erfindung allgemein dargestellt.

Ausgangspunkt des Verfahrens der Erfindung ist die Isolierung von mRNA oder von DNA aus Zellen, deren Antigene einer Untersuchung unterzogen werden sollen. Hierzu werden insbesondere Zellen humanen Ursprungs eingesetzt, wobei selbstverständlich auch Zellen tierischen Ursprungs, beispielsweise aus Nagern wie Mäusen oder Ratten, verwendbar sind. Bevorzugt handelt es sich um Zellen aus einem Patienten der an einem Tumor leidet, z. B. einem Tumor des blutbildenden Systems wie einem B Zell Tumor, z. B. einer Leukämie. Das Verfahren läßt sich jedoch auch für die Identifizierung von Autoantigenen oder von Fremdanitgenen anwenden, z.B aus mikrobiell infiziertem Gewebe (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen sowie jede beliebige Mischinfektion). Handelt es sich dabei um einen bekannten

Mikroorganismus, so kann dessen Erbinformation (in Form von RNA oder genomischer DNA) auch direkt verwendet werden.

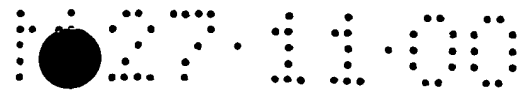
Die Isolierung der mRNA oder der DNA erfolgt durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden. Verwiesen sei hier beispielsweise auf Sambrook et al., (1989). Die mRNA wird anschließend durch ebenfalls bekannte Techniken in ihre cDNA umgeschrieben, um eine cDNA-Bank der Zelle zu gewinnen. Es wird hier auf die obige, beispielhaft genannte Veröffentlichung verwiesen.

Die auf der cDNA oder DNA festgelegte Information wird nunmehr in die Hülle von Influenza-Viren eingebracht. Die Vorgehensweise ist allgemein dargestellt wie folgt:

Die genetische Information für die von Influenza A Viren kodierten Proteine befindet sich auf 8 negativ-Strang RNAs, wobei die kodierenden Bereiche jeweils von Virus-spezifischen Promotor- und Terminationssequenzen flankiert werden, die sowohl Transkription als auch Verpackung der RNAs in Viruspartikel steuern.

Die Herstellung rekombinanter Influenza-Viren, d.h. die Verpackung eines Fremdgens in Influenza A Viruspartikel, und die Expression dieses Gens nach Infektion einer Zielzelle setzt voraus, daß dieses Gen erstens als negativ-Strang RNA vorliegt und zweitens virale Promotor- bzw. Verpackungssignale trägt. Dies kann beispielsweise erreicht werden durch die Verwendung eines Vektors, der neben einem Resistenzgen, beispielsweise für Ampicillin, und einem bakteriellem Replikationsursprung zusätzlich eine Polylinker-Sequenz die von nicht-translatierten Promotor- und Terminationssequenzen von Influenza A Virus flankiert wird. Diese wiederum liegen zwischen einem humanen Polymerase I Promotor und Transkriptions-Terminationssequenzen.

Zur Erstellung einer cDNA Bank werden die cDNAs aus dem zu untersuchenden Gewebe in die Polylinker-Sequenz dieses Plasmid in inverser Orientierung bezüglich des Polymerase I Promotors kloniert und in E.coli amplifiziert. Nach transienter Transfektion dieser Plasmide in geeignete Zielzellen entstehen durch die transkriptionelle Aktivität von RNA Polymerase I aus den einklonierten cDNAs negativ-Strang RNAs, die an ihren Enden virale Transkriptions- und Verpackungssignale tragen. Da die Verpackung der viralen RNAs in Viruspartikel nicht von der kodierenden Region, sondern ausschließlich von den regulatorischen Signalsequenzen



am 5'- und 3'-Ende abhängt, werden diese pseudoviralen RNAs nach Überinfektion der transfizierten Zellen mit Wildtyp-Influenza A Virus in die neugebildeten Viruspartikel eingebaut, und nach Lyse der Zellen in den Kulturüberstand abgegeben. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Viren werden geerntet und wahlweise weiter konzentriert. Selbstverständlich sind auch andere dem Fachmann bekannte oder von ihm im Rahmen der Versuche zu konstruierende Vektoren, die auf Influenza-Viren, aber auch auf den nachfolgend beschriebenen Retroviren beruhen, im Rahmen der Erfindung einsetzbar.

In einem nächsten Schritt werden autologe B-Zellen, die also aus dem gleichen Spender wie die Zellen stammen, aus denen die mRNA oder die DNA gewonnen wurde, mit den rekombinanten Viruspartikeln, die eine oder mehrere Kopien der cDNAs als negativ-Strang RNAs in ihrer Virushülle enthalten, infiziert. Die B-Zellen müssen vor der Infektion immortalisiert werden, wobei bevorzugt EBV-Gene eingesetzt werden. Es sind aber auch andere Immortalisierungssysteme bekannt, so z. B. Onkogene. Hierbei wird wie folgt vorgegangen:

Aus dem peripheren Blut des Spenders werden Lymphozyten (PBL) über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und mit EBV-haltigem Zellkulturüberstand z.B. der B95-8 Zelllinie inkubiert. Diese Affenzelllinie gibt infektiöses EBV in den Zellkulturüberstand ab, wodurch B-Zellen des Spenders infiziert und immortalisiert werden.

Zur Offenbarung wird beispielsweise auf die nachfolgenden Veröffentlichungen hingewiesen: v. Knebel Doeberitz et al., 1983; Rickinson et al., 1984.

Durch die Infektion der immortalisierten autologen B-Zellen kommt es zu einer Expression der aus der Ursprungszelle stammenden pseudoviralen Gensegmente, die ähnlich wie viruseigene negativ-Strang RNAs als Proteine exprimiert werden. Spaltprodukte dieser Proteine werden durch die zelleigene Antigen-Präsentationsmaschinerie in Verbindung mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche der B-Zellen präsentiert, wo sie von Antigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden können.

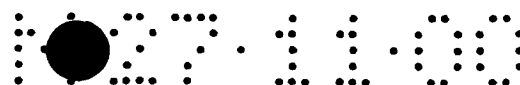
In einem nächsten Schritt werden deshalb Influenza-Virus infizierte B-Zellen mit T-Zell-Klonen co-kultiviert, die Spezifität für das zu identifizierende Antigen besitzen. Wurde durch die Influenza-Viren eine cDNA in die B-Zellen eingeschleust und exprimiert, welche für das von den T-Zellen erkannte Antigen kodiert, kommt es zu einer Stimulation der Antigen-spezifischen T-Zellen. Mit der Stimulation der T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor ist eine Freisetzung von Zytokinen verbunden, die durch bekannte Methoden, z. B. ELISA-Verfahren, nachweisbar ist. Selbstverständlich sind auch andere Verfahren einsetzbar, mit denen die Antigen-spezifische T Zell-Stimulation detektierbar ist. Hierzu gehören ausser dem Nachweis einer Zytokinexpression auch der Nachweis einer T-Zell vermittelten Zytotoxizität und andere meßbare Parameter der T-Zellaktivierung.

Waren innerhalb der Influenza-Viruspopulation Viruspartikel dabei, die für das betreffende Antigen kodieren und T-Zellen zur Zytokinfreisetzung gebracht haben, wird die Viruspopulation in kleinere Pools aufgeteilt und mit diesen die Infektion der B-Zellen und die Prozedur der Antigenerkennung wiederholt. Nach Vereinzelung der Viren, die für das Antigen kodieren, kann in einem folgenden Schritt die Isolierung und Identifizierung des von den T-Zellen erkannten Antigens erfolgen.

Als Alternative für die rekombinanten Influenza-Viren können auch rekombinante Retroviren für die Infektion von autologen LCL und zur Expression der zu identifizierenden Antigene eingesetzt werden. Mit Retroviren ist eine ähnlich gute Transduktionseffizienz wie mit Influenza Viren zu erreichen, Retroviren erreichen jedoch nicht das hohe Expressionsniveau von Influenza Viren. Die Herstellung rekombinanter Retroviren ist im Stand der Technik ausführlich beschrieben und nur beispielhaft wird hier auf die Veröffentlichung von Kinsella et al. verwiesen.

Im folgenden ist die Beschreibung von zwei Versuchen dargestellt, so wie sie im Labor, einmal mit rekombinanten Influenza Viren und einmal mit rekombinanten Retroviren, durchgeführt wurden.

Herstellung rekombinanter Influenza Viren, Infektion autologer LCL und Erkennung eines Modellantigens



Der offene Leserahmen des Neomycin-Phosphotransferase II Gens wurde in die Polylinker-Sequenz des oben beschriebenen Plasmids in inverser Orientierung bezüglich des Polymerase I Promotors einkloniert, und E. coli damit transformiert. Für die Erkennung des Neomycin-Phosphotransferase II Genprodukts stehen im Labor Antigen-spezifische T-Zellen zur Verfügung. Nach präparativer Plasmidaufarbeitung mit Hilfe kommerziell vertriebener Verfahren (Qiagen Maxi Prep Kit) wurden 5µg Plasmid DNA mit 185µl Medium und 15µl LipofectamineTM (Gibco BRL) gemischt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3 ml Medium wurde das Gemisch auf $2,5 \times 10^6$ 293T Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde der Überstand abgenommen und durch Zellmedium ersetzt. 18 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und mit Influenza A Virus überinfiziert (MOI = 1), und weitere 15 Stunden später rekombinantes Virus im Zellüberstand geerntet. Zur Erhöhung des Virustiters wurden 1×10^7 MDCK Zellen mit 1 ml Virusüberstand inkubiert. Mit 10µl des wiederum nach 15 Stunden geernteten Kulturüberstandes wurden 1×10^5 LCL infiziert und anschließend mit der gleichen Zahl Antigen-spezifischer T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

Herstellung von rekombinanten Retroviren, Infektion von autologen LCL und Erkennung eines Modellantigens durch Antigen-spezifische T-Zellen

Als Modellantigen für die MHC Klasse II restringierte T Zell Erkennung nach retroviraler Transduktion wurde wiederum das Neomycin-Phosphotransferase II Gen, und für die Bestimmung der Infektionseffizienz, das green fluorescence protein (GFP) verwendet. Die offenen Leserahmen beider Gene wurden zwischen die 5' und 3' retroviralen long terminal repeats (LTR) von Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) in dem Plasmid PINCO (Grignani et al., 1998) einkloniert, und wie oben beschrieben in E.coli amplifiziert. Um rekombinante Retroviren herzustellen, wurden 5µg Plasmid DNA mit 370µl Medium (ohne FCS) und 30µl LipofectamineTM (Gibco BRL) gemischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe weiterer 3ml Medium wurde das Gemisch auf 2×10^6 Zellen der amphotropen Verpackungszelllinie Phoenix gegeben und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. 24 Stunden nach Transfektion wurden 2µg Puromycin / ml Kulturmedium zugegeben, wodurch nur Zellen überleben, die den PINCO Vektor aufgenommen haben. Nach 48 stündiger Puromycin Selektion wurden die Zellen gewaschen und in Medium ohne Puromycin

aufgenommen. Der virushaltige Kulturüberstand wurde nach 48-72 Stunden geerntet, der Virustiter lag bei 2×10^6 Viren pro ml Kulturmedium.

Zur Infektion von LCL wurden 1×10^5 Zellen in 2ml Virusüberstand aufgenommen und Polybrene in einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen bei 1800rpm in einer Varifuge 3.2RS (Heraeus) für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zugabe von neuem Virusüberstand und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen für 12h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Virusüberstand durch Kulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach Infektion wurden 1×10^5 infizierte LCL mit der gleichen Anzahl an Antigen-spezifischen T-Zellen co-kultiviert. Nach 20 Stunden wurde die GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt.

Literatur

- Boon, T. (1993). Tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes; present perspectives for specific immunotherapy. *Int. J. Cancer* 54; 177-180.
- Rosenberg, S.A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of genes encoding cancer regression antigens. *J. Natl. Cancer Inst.* 88; 1635-1644.
- Cox, A.L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R.A., Darrow, T.L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D.F., and Slingluff, C.L. (1994). Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytolytic T cell lines. *Science* 264; 716 - 719.
- Wang, R.F., Wang, X., Johnston, S.L., Zeng, g., Robbins, P.F., and Rosenberg, S.A. (1998). Development of a retrovirus-based complementary DNA expression system for the cloning of tumor antigens. *Cancer Res.* 58; 3519-3525.
- Rosenberg, S. A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10; 281-287.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- v. Knebel Doeberitz, M., Bornkamm, G. W., and zur Hausen, H. (1983). Establishment of spontaneously outgrowing lymphoblastoid cell lines with cyclosporin A. *Med. Microbiol. Immunol.* 172; 87-99.
-
- Rickinson, A. B., Rowe, M., Hart, I. J., Yao, Q. Y., Henderson, L. E., Rabin, H., and Epstein, M. A. (1984). T-cell mediated regression of 'spontaneous' and of Epstein-Barr Virus-induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cellular Immunology* 87; 646-658.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F, Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene

transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Research* 58; 14-19.

Kinsella, T.M. and Nolan, G.P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Human Gene Therapy* 7, 1405-1413.

Miletic, H., Bruns, M., Tsiakas, K., Vogt, B., Rezai, R., Baum, c., Kühlke, K., Cosset, F.-L., Ostertag, W., Lothar, H., and von Laer, D. (1999). Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. virol.* 73, 6114-6116.

Neumann, G., Watanabe T., Ito, II., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, d.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., and Kawaoka, Y. (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9345-9350.

DR. rer.nat. HORST REINHARD (+1998)
DIPL.- ING. UDO SKUHRA
DIPL.- ING. REINHARD WEISE
DR. rer.nat. WERNER BEHNISCH
DR. rer.nat. STEPHAN BARTH
DIPL.- ING. JÜRGEN METZLER*
DIPL.- DIPL.- ING. GLYN CHARLES (DPA)

FRIEDRICHSTR. 31
D-80801 MÜNCHEN
P.O. BOX 440151
D-80750 MÜNCHEN
Tel. +49-89-3816100
Fax. +49-89-3401479

* MOHRENSTR. 20
D-96450 COBURG
Tel. +49-9561-871538
Fax. +49-9561-871539

Ihr Zeichen/your ref.

Unser Zeichen/our ref.

München/Munich

P11774
Dr.B/Go

26. Oktober 1999

Anmelder:

GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim

**VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON
MHC-RESTRINGIERTEN ANTIGENEN**

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:
 - a) Herstellen einer Genbank oder cDNA-Bank aus einer zu untersuchenden Zelle oder einem zu untersuchenden Mikroorganismus;

- b) Herstellen rekombinanter Influenza-Viren oder Retroviren, die in ihrer Virushülle ein oder mehrere rekombinante pseudo-virale, von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleitete Gensegmente enthalten;
- c) Gewinnen der rekombinanten Viruspartikel;
- d) Infizieren von immortalisierten autologen Zellen, die MHC Klasse I und/oder MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, mit den rekombinanten Viruspartikeln;
- e) Exprimieren von durch die cDNA oder die DNA der Genbank kodierten Proteinen in den autologen Zellen und Präsentieren der von der autologen Zelle erzeugten Spaltprodukte dieser Proteine auf der Zelloberfläche in Verbindung mit MHC Molekülen;
- f) Co-Kultivieren von T-Zellen mit den autologen Zellen;
- g) Stimulieren der T Zellen durch solche autologen Zellen, die ein durch die T Zellen erkanntes Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren;
- h) Vereinzelung der Klone, die das Antigen exprimieren, und Identifizieren des Antigens.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Zelle eine tierische oder humane Eukaryontenzelle ausgewählt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Eukaryontenzelle eine Tumorzelle oder eine durch einen Mikroorganismus infizierte Zelle eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
eine durch einen Virus oder ein Bakterium oder einen Pilz oder einen Protozoen oder aus einer Kombination eines oder mehrerer dieser Mikroorganismen infizierte Zelle eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß

das Herstellen rekombinanter Influenza-Viren durch das Einbringen von von der cDNA oder der DNA der Genbank abgeleiteten negativ-Strang RNAs in die Hülle von Influenza-Viren erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Influenza-Viren Influenza A-Viren und als Retroviren amphotrope oder pseudotypisierte Retroviren, sowie Lentiviren eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Herstellung der negativ-Strang RNA durch Transkription der pseudoviralen Gensegmente mit der RNA Polymerase I erfolgt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
nach Einbringen der cDNA oder der DNA der Genbank eine Überinfektion mit Wildtyp Influenza A-Virus erfolgt.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
durch Selektion eine Anreicherung der rekombinanten Viruspartikel erfolgt.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Spaltprodukte der Proteine in Verbindung mit MHC Klasse I oder MHC Klasse II auf
der B Zelle präsentiert werden.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Stimulation der Antigen spezifischen T Zellen durch Freisetzung von Zytokinen erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Freisetzung der Zytokine durch ein ELISA Verfahren nachgewiesen wird.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Immortalisierung der autologen Zellen mit Hilfe von EBV-Genen oder Onkogenen erfolgt.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Co-Kultivierung der B Zellen mit T Helferzellen bei MHC Klasse II restringierten Antigenen und mit zytotoxischen T Zellen bei MHC Klasse I restringierten Antigenen erfolgt.
15. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Genbank oder cDNA-Bank aus einem Virus, einem Bakterium, einem Pilz oder einem Protozoen hergestellt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
als autologe Zellen B Zellen oder dendritische Zellen eingesetzt werden.
-

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von MHC-restringierten Antigenen.

Abbildung 1

1/2

LCL Infektion mit Influenza

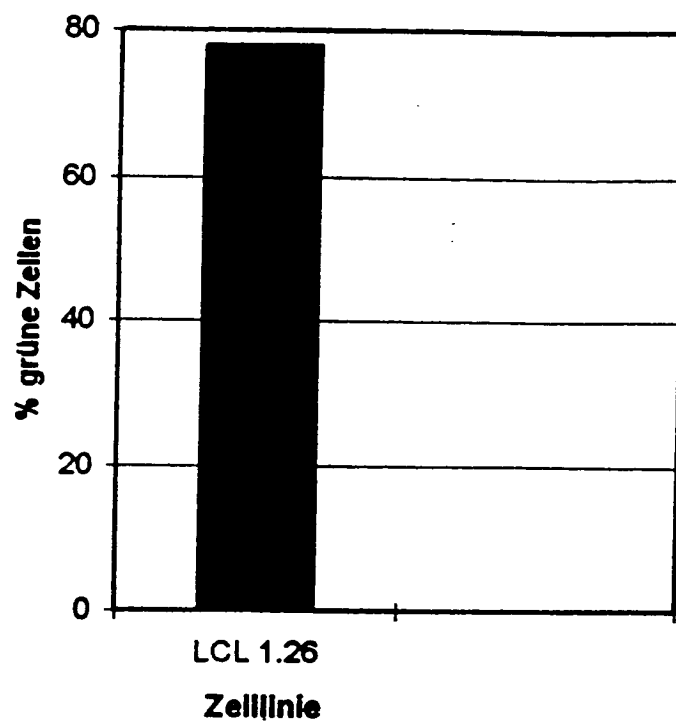


Abbildung 2

Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC II

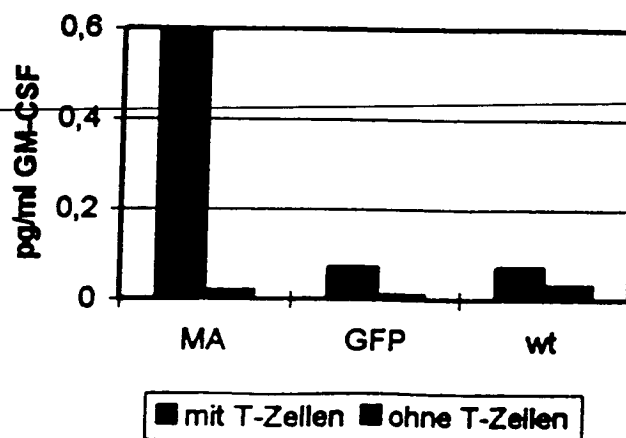


Abbildung 3:

LCL Infektion mit Retroviren

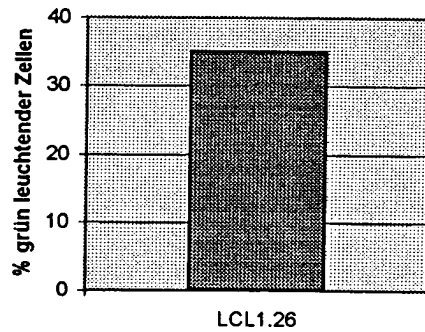


Abbildung 4:

Präsentation des Modellantigens im Kontext von MHC Klasse II Molekülen nach Infektion mit rekombinanten Retroviren.

